

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07C 50/36, A61K 35/78	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/41220 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. August 1999 (19.08.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/00737 (22) Internationales Anmeldedatum: 4. Februar 1999 (04.02.99) (30) Prioritätsdaten: 198 05 947.7 13. Februar 1998 (13.02.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DR. WILLMAR SCHWABE GMBH & CO. [DE/DE]; Willmar-Schwabe-Strasse 4, D-76227 Karlsruhe (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CHATTERJEE, Shyam, Sunder [DE/DE]; Stettiner Strasse 1, D-76139 Karlsruhe (DE). ERDELMEIER, Clemens [DE/DE]; Glogauer Strasse 32, D-76139 Karlsruhe (DE). KLESSING, Klaus [DE/DE]; Rheingoldstrasse 3, D-76275 Ettlingen (DE). MARMÉ, Dieter [DE/DE]; Kaschnitzweg 25, D-79104 Freiburg (DE). SCHÄCHTELE, Christoph [DE/DE]; Darriwald 16, D-79108 Freiburg (DE). (74) Anwalt: BUNKE, Holger, Prinz & Partner, Manzingerweg 7, D-81241 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, DE, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: STABLE HYPERFORIN SALTS, METHOD FOR PRODUCING SAME AND THEIR USE IN THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE (54) Bezeichnung: STABILE HYPERFORIN-SALZE, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND VERWENDUNG ZUR THERAPIE DER ALZHEIMERSCHEN KRANKHEIT (57) Abstract <p>The invention relates to new hyperforin and adhyperforin salts, methods for producing same and their use. The cation of said salts is either an alkali metal ion or an ammonia ion of a salt-forming nitrogenous base, which salt-forming nitrogenous base is preferably a pharmaceutically active ingredient. The salts are used, among other things, for enriching or obtaining in the pure form hyperforin and adhyperforin from St. John's wort extracts and for the stable storage of hyperforin, adhyperforin and their mixtures. The pharmaceutical preparations containing said salts are used in the treatment of Alzheimer's disease. The treatment of Alzheimer's disease is cited as second medical indication for medicines containing hyperforin, adhyperforin or their mixtures.</p> (57) Zusammenfassung <p>Es werden neue Salze des Hyperforins und Adhyperforins, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung beschrieben. Das Kation dieser Salze ist entweder ein Alkalimetallion oder ein Ammoniumion einer salzbildenden Stickstoffbase, wobei die salzbildende Stickstoffbase vorzugsweise ein Arzneimittel-Wirkstoff ist. Die Salze dienen unter anderem der Anreicherung bzw. Reingewinnung von Hyperforin und Adhyperforin aus Johanniskraut-Extrakten sowie der stabilen Lagerhaltung von Hyperforin, Adhyperforin und deren Gemischen. Die Salze enthaltende pharmazeutische Zubereitungen werden zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit verwendet. Für Arzneimittel, die Hyperforin, Adhyperforin oder deren Gemische enthalten, wird die Behandlung der Alzheimer-Krankheit als zweite medizinische Indikation offenbart.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauritanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Stabile Hyperforin-Salze, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung zur Therapie der Alzheimerschen Krankheit.

Gegenstand der Erfindung:

Gegenstand der Erfindung ist die Bereitstellung stabiler Salze des Hyperforins und Adhyperforins, welche als solche oder durch Freisetzung des Hyperforins bzw. Adhyperforins pharmakologisch wirksam werden können. Ein wesentlicher Aspekt der Erfindung betrifft die Bereitstellung eines Verfahrens zur Anreicherung bzw. Reingewinnung des Hyperforins und Adhyperforins aus Johanniskraut-Extrakten mittels Ausfällung in Form solcher stabiler Salze. Ein weiterer besonders bedeutsamer Gegenstand der Erfindung besteht darin, neue Wirkstoffe gegen die Alzheimersche Krankheit (im folgenden abgekürzt als "AD"), die einen kausaltherapeutischen Ansatz aufweisen, bereitzustellen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Bereitstellung von Wirkstoff-Kombinationen, die nicht nur zur kausalen Therapie der AD angewandt werden können, sondern gleichzeitig auch die bei der AD häufig auftretenden psychopathologischen Begleiterscheinungen wie Ängstlichkeit, Depressionen und cognitive Störungen beseitigen, erheblich bessern oder zumindest deren Progression aufhalten können.

Hintergrund der Erfindung:

Das amyloide Peptid A β 1-42, ein Prozessierungsprodukt des Alzheimer Precursor Proteins APP, spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung der AD [Lamb, B.T.: Presenilins, amyloid- β and Alzheimer's disease. Nature Med. 3 (1997) 28-29. Selkoe, D.J.: Alzheimer's Disease: Genotypes, Phenotype, and Treatments. Science 275 (1997) 630-631.]. Diese Hypothese wird gestützt durch folgende experimentelle Befunde:

APP Missense-Mutationen (Patienten mit familiärer AD) führen zu erhöhter Freisetzung von A β 1-42 [Scheuner, D. et al.: Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. Nature Med. 2 (1996) 864-870.].

Mutationen in Presenilin 1 und Presenilin 2 (Patienten mit familiärer AD) führen ebenfalls zu einem Anstieg an freigesetztem A β 1-42 [Scheuner, D. et al.]. Transgene Mäuse, die mutiertes APP überexprimieren, entwickeln altersabhängige Ablagerungen von A β und zeigen kognitive Störungen [Games, D. et al.: Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. Nature 373 (1995) 523-527. Hsiao, K. et al.: Correlative Memory Deficits, A β Elevation, and Amyloid Plaques in Transgenic Mice. Science 274 (1996) 99-102.]

Die proteolytische Spaltung des pathogenen A β aus dem Alzheimer Precursor Protein APP wird vermittelt durch die β - und γ -Sekretase, deren molekulare Identität nicht bekannt ist. Die α -Sekretase prozessiert APP zu einer löslichen Form (sAPP) und einem cytoplasmatischen Rest. Der Schnitt der α -Sekretase liegt innerhalb von A β , so daß in diesem Fall kein pathogenes A β entsteht. Die molekulare Identität der α -Sekretase ist ebenfalls nicht bekannt.

Die α -Sekretase wird stimuliert durch Acetylcholin, vermittelt durch die muscarinischen Rezeptoren m1 und m3 [Nitsch, R.M. et al.: Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. Science 258 (1992) 304-307]. Zellulärer Mediator ist die Proteinkinase C ("PKC"). Dies belegen auch Experimente, die nach direkter Stimulierung der PKC durch Phorbol ester zum gleichen Ergebnis kommen [Buxbaum, J.D. et al.: Processing of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein: Modulation by agents that regulate protein phosphorylation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 6003-6006].

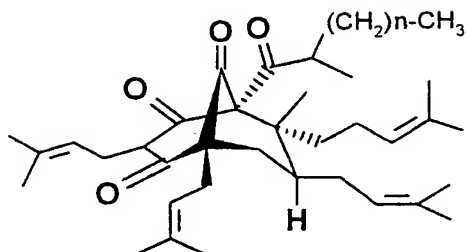
Tacrin, das bislang erfolgreichste Therapeutikum gegen die AD ist ein Acetylcholinesterase-Inhibitor [Giacobini, E.: Cholinomimetic therapy of Alzheimer disease: Does it slow down deterioration? In Recent Advances in the Treatment of Neurodegenerative Disorders and Cognitive Dysfunction, Int. Acad. Biomed. Drug Res. 7 (1994) 51-57. Racagni, G. et al., eds. Basel: Karger].

Das lässt sich interpretieren als eine indirekte Stimulierung der α -Sekretase durch folgende Signalkette: Tacrin hemmt die Acetylcholinesterase. Dadurch wird die Konzentration von Acetylcholin erhöht. Acetylcholin aktiviert über die muscarinischen Rezeptoren m1 und m3 die PKC. Dadurch wird die Aktivität der α -Sekretase erhöht. Als Folge wird die Menge an pathogenem A β erniedrigt.

Aus diesen Befunden lässt sich ableiten, daß selektive Aktivierung der PKC ein wirksamer therapeutischer Ansatz zur Hemmung der Produktion von amyloidogenem A β und damit zur Behandlung der AD sein kann. Da von allen 11 PKC-Isoenzymen die γ -Form als einziger Subtyp ausschließlich in neuronalen Zellen exprimiert wird, stellen Substanzen, die die PKC- γ stimulieren, einen neuen Ansatzpunkt zur Therapie der AD dar. Darüber hinaus sind alle Substanzen oder Prozesse, die die α -Sekretase stimulieren bzw. die β - und γ -Sekretase inhibieren, zur Verhinderung der Freisetzung von pathogenem A β und damit zur kausalen Therapie der AD geeignet.

Stand der Technik:

Das Phloroglucin-Derivat Hyperforin ist einer der Hauptinhaltsstoffe in frischem Johanniskraut. Es wird in geringerer Konzentration begleitet von seinem Homologen Adhyperforin. Da beide Substanzen sehr instabil gegenüber Licht- und Lufteinfluss sind, nimmt ihr Gehalt bereits bei der Trocknung der Frischpflanze ab. Durch schnelle und schonende Trocknung, gefolgt von geeigneten Extraktionsverfahren können Extrakte mit Gehalten von etwa 3 - 60% Hyperforin/Adhyperforin gewonnen werden [DE 19619512 C1].



Hyperforin (n = 0),

Adhyperforin (n = 1)

Ohne Zusatz geeigneter Stabilisierungsmittel ist das Hyperforin jedoch nicht stabil und kann daher nur unter hohem technischen Aufwand in angereicherter oder reiner Form gewonnen und gelagert werden.

In EP-A-0599307 wurde bereits auf die Bedeutung des Hyperforins zur Erzielung der antidepressiven Wirksamkeit von Johanniskraut-Extrakten hingewiesen. Inzwischen wurde wissenschaftlich belegt, dass Hyperforin aufgrund seines pharmakologischen Profils einen wesentlichen Einfluss bei der medizinischen Behandlung von Depressionen und weiterer Serotonin-abhängiger Erkrankungen ausübt [S.S. Chatterjee et al., Hyperforin and Hypericum extract, Interactions with some Neurotransmitter Systems (SL-82), 2nd Intern. Congress on Phytomedicine, Sept. 11-14, 1996, München. Siehe auch: Pharmacopsychiatry 1998, 31 Suppl.I, 1-60].

Die Alzheimer-Demenz (AD) ist eine schwerwiegende, schleichend beginnende Krankheit, die besonders in fortgeschrittenem Alter einen erheblichen Anteil der Bevölkerung befällt. Sie ist gekennzeichnet durch anfängliche Vergesslichkeit, dann zunehmende Gedächtnisstörungen und Einbußen bei weiteren kognitiven Fähigkeiten. Sie endet mit dem völligen geistigen Verfall und Persönlichkeitsverlust und verläuft letztlich lethal. Es steht bislang keine befriedigende, kausal orientierte Therapie der AD zur Verfügung [K. Mendla, Die Alzheimer-Krankheit: Neue Ansätze in der Pharmakotherapie (1996). Pharm.Ztg. 141, 351-356].

Technisches Problem.

Das der Erfindung zugrunde liegende technische Problem besteht demnach darin, dass zum einen keine technisch befriedigende Methode zur Gewinnung und Stabilisierung von reinem bzw. stark angereichertem Hyperforin und Adhyperforin bekannt ist, wodurch

die Isolierung, Lagerung und Verwendung dieser Substanzen sehr behindert ist, und dass zum anderen ein Mangel an Wirkstoffen zur kausal orientierten Therapie der Alzheimerschen Krankheit besteht, wodurch immense Kosten im menschlichen Sozialbereich entstehen. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, diesen Mängeln abzuhelpfen.

Lösung des technischen Problems.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch

- die neuen Salze des Hyperforins und Adhyperforins gemäß den Patentansprüchen 1 bis 5;
- das Verfahren zur Herstellung dieser Salze gemäß Patentanspruch 6;
- das Verfahren zur Anreicherung bzw. Reingewinnung von Hyperforin und Adhyperforin in Form dieser Salze, gemäß den Patentansprüchen 7 und 8;
- die Verwendung dieser Salze zur stabilen Lagerhaltung von Hyperforin, Adhyperforin und deren Gemischen, gemäß Patentanspruch 9;
- die pharmazeutische Zubereitung gemäß Patentanspruch 10 sowie
- die neue Verwendung von Hyperforin, Adhyperforin und deren Gemischen als Arzneimittel zur Behandlung der AD (2. medizinische Indikation).

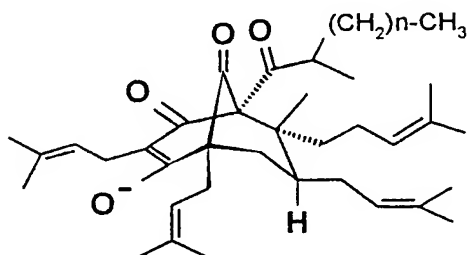
Es wurde überraschenderweise gefunden, dass die Instabilität des Hyperforins bzw. des Adhyperforins durch Überführung desselben in geeignete Salze der allgemeinen Formel I



vollständig aufgehoben oder zumindest erheblich vermindert werden kann. Salze des Hyperforins sind bisher nicht bekannt.

Hierbei bedeuten in Formel I m eine ganze Zahl von 1 bis 3 und $[A^-]$

das Anion des Hyperforins bzw. des Adhyperforins, wobei $n = 0$ oder 1 ist (allgemeine Formel II):

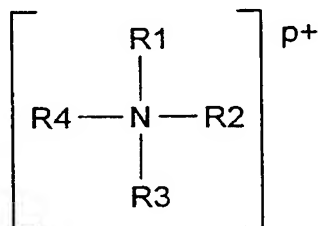


(II)

und $[B]P^+$ bedeutet entweder

ein Alkalimetallion, vorzugsweise Li^+ , Na^+ oder K^+ , wobei $p = 1$ ist,

oder ein Ammoniumion einer salzbildenden Stickstoffbase der allgemeinen Formel III,



(III)

worin die Reste $R1$, $R2$ und $R3$,

unabhängig voneinander, ein Wasserstoffatom, eine geradkettige oder verzweigte Alkyl-, Cycloalkyl-, Bicycloalkyl-, Tricycloalkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Heterocyclalkyl-, Aryl-, Heteroaryl, Arylalkyl- oder Heteroarylalkyl-Gruppe oder ein durch einen oder mehrere Hydroxy-, Alkoxy-, Aryloxy-, Alkanoyl-, Aroyl-, Carboxy-, Alkoxycarbonyl-, Amino-, Alkylamino-, Hydroxylamino-, Amido-, Carbamoyl-, Ureido-, Amidino-, Guanidino-, Cyano-, Azido-, Mercapto-, Alkylthio-, Alkylsulfoxy-, Alkylsulfonyl-, Alkylsulfenyl-, Aminosulfonyl-, Fluor-, Chlor-, Brom-, Jod-, Alkyl- oder Perfluoralkyl-Rest(e) substituiertes Derivat der genannten Gruppen bedeuten,

oder worin die Reste R1 und R2 zusammen mit dem N-Atom einen Azetidin-, Pyrrolidin-, Pyrrolin-, Piperidin-, Piperazin-, Homopiperazin-, Morpholin-, Thiomorpholin-, Pyridin-, Di- oder Tetrahydropyridin-, Pyrimidin-, Pyrazin-, Azepin-, Dihydroazepin-, Oxazepin-, Diazepin-, Imidazol-, Pyrazol-, Oxazol- oder Thiazol-Ring oder einen der genannten Ringe bedeuten, der ankondensierte aliphatische, heteroaliphatische, aromatische oder hetero-aromatische Ringe aufweist und/oder durch einen oder mehrere Hydroxy-, Alkoxy-, Aryloxy-, Alkanoyl-, Aroyl-, Carboxy-, Alkoxycarbonyl-, Amino-, Alkylamino-, Hydroxylamino-, Amido-, Carbamoyl-, Ureido-, Amidino-, Guanidino-, Cyano-, Azido-, Mercapto-, Alkylthio-, Alkylsulfoxy-, Alkylsulfonyl-, Alkylsulfenyl-, Aminosulfonyl-, Fluor-, Chlor-, Brom-, Jod-, Alkyl- oder Perfluoralkyl-Rest(e) substituiert ist,

und worin der Rest R4 ein Wasserstoffatom oder eine geradkettige oder verzweigte Alkylgruppe bedeutet, wobei $p = m$ ist und die Gesamtanzahl positiver Ladungen des Rests [B] angibt.

Besonders bevorzugt sind die N,N-Dicyclohexylamin-Salze des Hyperforins und Adhyperforins sowie deren Gemische.

Aus der oben angeführten Definition der als Salzbildner dienenden Base B geht hervor, dass eine Vielzahl basischer Stickstoffverbindungen dazu geeignet ist, die Stabilität des in ungeladener Form instabilen Hyperforins bzw. Adhyperforins in befriedigender Weise zu erhöhen.

Geeignete Basen sind z. B.:

- ggf. durch eine oder mehrere Hydroxylgruppen substituierte aliphatische und cycloaliphatische Amine oder Polyamine wie mono-, di- oder tri-(C₃ bis C₂₀)-Alkylamine, Aminoethanol, Methylaminoethanol, Dimethylaminoethanol, Cholin, 2-Hydroxy-1,1-dimethylethylamin, Tris-(hydroxymethyl)-methylamin, N-Methyl-D-glucamin, Ethylendiamin, Dicyclohexylamin, N-

- Cyclohexyl-N-3-aminopropylamin, 1-Aminoadamantan oder 1-Amino-3.5-dimethyladamantan,
- ggf. durch eine oder mehrere Niederalkyl-(= C₁ bis C₄-Alkyl) oder Hydroxyl-Reste substituierte cyclische oder heterocyclische Amine wie Pyrrolidin, Piperidin, Morpholin, Piperazin, N-Methylpiperazin oder N-Methylhomopiperazin,
 - ggf. substituierte aromatische, heteroaromatische, arylaliphatische oder heteroarylaliphatische Amine wie Benzylamin, 3.4.5-Trimethoxybenzylamin, Veratrylamin, Phenethylamin, Homoveratrylamin, N-Methylhomoveratrylamin, 4-Aminopyridin, Tacrin und Analoga, Imipramin, Desipramin, Selegilin, Nicotin, Pindolol,
 - Aminosäureester und -amide wie Methyl-, Ethyl-, Propyl- oder Isopropylester und Amide von Glycin, Alanin, Phenylalanin, Leucin, Isoleucin, Methionin, Prolin, Valin, Sarcosin, Pipecolinsäure,
 - sowie basische Aminosäuren wie Lysin oder Arginin oder deren Amide.

Besonders geeignete Basen sind solche, die selber Wirkstoffe sind und den gleichen medizinischen Indikationsbereich wie das Hyperforin besitzen oder dessen therapeutische Verwendung unterstützen. Infrage kommen hierzu vor allem basische Wirkstoffe mit den Indikationen:

- **Alzheimersche Krankheit (AD), z. B.**
Acetylcholinesterase-Inhibitoren (z. B. Amiridin, Donezepil, Ensaculin, Eptastigmin, Galanthamin, Huperzin A, 7-Methoxytacrin, Physostigmin, SDZ-ENA-713 (Exelon), SM-10888, Suronacrin, Tacrin, Velnacrin), cholinerge Aktivatoren, NMDA-Antagonisten (z. B. Memantin), Glutaminrezeptor-Antagonisten, Serotonin-Agonisten und Antagonisten (z. B. Adatanserin), Monoaminoxidase-Inhibitoren (z. B. Tranylcypromin, Selegelin), PKC-Aktivatoren und α -Sekretasehemmer, Tyrosinkinase-Antagonisten, Muscarin-Agonisten (z. B. Arecolin, BIBN 99, Itamelin, Milamelin, Talsaclidin, Xanomelin, YM796),
- **Antidepressiva, z.B.** Amitryptilin, Dibenzepin, Desipramin, Desitryptilin, Dosulepin, Doxepin,

Clomipramin, Fluoxetin, Fluvoxamin, Imipramin,
Lofepramin, Maprotilin, Moclebamid, Mianserin, Nor-
triptylin, Opipramol, Paroxetin, Tranylcypromin,
Trazodon, Trimipramin, Viloxazin

- Anxiolytika, z. B. Chlorprothixen, Dixyrazin, Fluphenazin, Levomepromazin, Melperon, Perphenazin, Promazin, Promethazin, Pritiphendyl, Sulpirid, Tandospiron, Thioridazin, Trifluoperazin, Zuclopentixol,
- Calcium-Antagonisten (mit basischer Seitenkette) z. B. Amlodipin, Azelnidipin, Barnidipin, Benidipin, Cronidipin, Edrecolomab (AE0047), Efonidipin, Elgodipin, Lercanidipin, Manidipin, Nicardipin, Palonidipin, Verapamil,
- Dyspepsie-Therapeutika und Prokinetika, z. B. Cisaprid, Metoclopramid, Renzaprid (5-HT₄ Agonisten),
- ~~β-Rezeptorenblocker, z. B. Atenolol, Alprenolol, Carazolol, Propranolol, Labetalol, Mepindolol, Metoprolol, Oxprenolol, Penbutolol, Pindolol, Bupranolol, Bunitrolol, Metipranolol, Nadolol,~~
- Nootropica, z. B. Lomerizin, Nebracetam, Pramiracetam, SNK-882.

Salze des Hyperforins und Adhyperforins mit derartigen basischen Wirkstoffen bilden einen besonders innovativen Teilaspekt der vorliegenden Erfindung, da sie nicht nur die Stabilität des therapeutisch wirksamen Hyperforins erhöhen, sondern zusätzlich infolge ihrer eigenen therapeutischen Wirkung eine besonders sinnvolle Kombination sich gegenseitig verstärkender oder unterstützender Wirkprinzipien erlauben.

Herstellung der erfindungsgemässen Salze:

Die erfindungsgemässen Salze können auf verschiedenen Wegen hergestellt werden. Bei der folgenden Methoden-Erläuterung sind mit dem Begriff "Hyperforin" stets auch das Homologe Adhyper-

forin sowie auch Gemische aus beiden Substanzen gemeint.
"Nieder-" bedeutet immer "C₁ bis C₄ -".

Methode A: Hyperforin wird in einem Niederalkanol (z. B. Methanol, Ethanol, Propanol oder Isopropanol) vorzugsweise unter Schutzgas und Lichtausschluss gelöst, mit der Lösung einer equimolaren Menge Alkalimetall-Hydroxid oder -Nieder-alkanolat (z. B. Natrium-Methylat oder -Ethylat) in einem der zuvor genannten Niederalkanole versetzt, die Lösung evaporiert, mit Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Man erhält stabile farblose bis cremefarbene pulverförmige Alkalisalze des Hyperforins. Alternativ kann das Hyperforin auch direkt in der Lösung des Alkalimetall-Niederalkanoats aufgelöst und wie oben aufgearbeitet werden.

Methode B: Hyperforin wird in einem aprotischen Lösungsmittel, ausgewählt aus der Gruppe der apolaren C₁-C₁₀-Alkane und -Cycloalkane, z. B. Pentan, Hexan, Heptan, Octan, Isooctan oder Cyclohexan, ggf. unter Zugabe geringer Mengen eines niederen Alkanols (z. B. Methanol, Ethanol oder Isopropanol) vorzugsweise unter Schutzgas und Lichtausschluss gelöst, diese Lösung mit der equimolaren Menge der basischen Komponente B oder einer Lösung derselben in einem der zuvor angegebenen Lösungsmittel oder in einem Niederhalogenalkan, z. B. Dichlormethan oder Chloroform, oder in einem niederen Ether, z. B. Diethylether, Diisopropylether, tert.-Butylmethylether oder Tetrahydrofuran, oder in einem niederen Keton, z. B. Aceton oder Methylethylketon, versetzt, die Mischung ggf. konzentriert, das ausfallende Salz abgetrennt, ggf. umkristallisiert und im Vakuum getrocknet. Man erhält kristalline oder amorphe pulverförmige Ammoniumsalze des Hyperforins.

Falls die Base B mehrere zur Salzbildung fähige basische Zentren enthält, können, falls gewünscht, entsprechend geringere Mengen z. B. 1/2-molare oder 1/3-molare Mengen, an Base B eingesetzt werden, sodass das Verhältnis Hyperforin/Base = m/p beträgt.

Methode C: Hyperforin wird in einem Niederalkanol (z. B. Methanol, Ethanol oder Isopropanol), vorzugsweise unter Schutzgas und Lichtausschluss, gelöst, diese Lösung mit der equimolaren Menge der basischen Komponente B oder einer Lösung derselben in einem

der zuvor angegebenen Lösungsmittel versetzt, die Mischung evaporiert, in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Man erhält kristalline oder amorphe pulverförmige Ammoniumsalze des Hyperforins.

Methode D: Hyperforin wird in einem Niederalkanol (z. B. Methanol, Ethanol oder Isopropanol), vorzugsweise unter Schutzgas und Lichtausschluss, gelöst, diese Lösung mit der Lösung einer equimolaren Menge der basischen Komponente B in Wasser versetzt, der niedere Alkohol weitgehend im Vakuum abdestilliert und das verbleibende wässrige Gemisch ggf. nach Zusatz von Wasser lyophilisiert. Das erhaltene pulverförmige Salz wird ggf. aus einem niederen Alkohol, Alkohol/Wasser-Gemisch oder aus einem niederen Ester umkristallisiert.

Verfahren zur Anreicherung bzw. Reinisolierung von Hyperforin und Adhyperforin aus Johanniskraut-Extrakten:

Bisher war die Reingewinnung von Hyperforin aus Johanniskraut-Extrakt nur über sehr aufwendige chromatographische Methoden möglich, die zudem in technisch unzumutbarer Weise durch die hohe Instabilität des Hyperforins und seines Homologen gegenüber Licht und Luftsauerstoff erschwert wurden (P. Maisenbacher, Universität Tübingen, Diss. 1991. R. Burgdörfer, Universität Marburg, Diss. 1987).

Es wurde nun eine überraschend einfache und kostensparende Lösung dieses technischen Problems gefunden, indem man Johanniskraut-Extrakte, z.B. einen CO₂-Extrakt mit 20-80% Hyperforin/Adhyperforin-Gehalt, in einem geeigneten Lösungsmittel, ausgewählt aus der Reihe apolarer C₁-C₁₀-Alkane und -Cycloalkane, z. B. Pentan, Hexan, Heptan, Octan, Isooctan oder Cyclohexan, ggf. unter Zugabe geringer Mengen eines niederen Alkanols (z. B. Methanol, Ethanol oder Isopropanol), vorzugsweise unter Schutzgas und Lichtausschluss, löst, diese Lösung mit der mindestens equimolaren Menge der basischen Komponente B oder einer Lösung derselben in einem der zuvor angegebenen Lösungsmittel oder in einem Niederhalogenalkan, z. B. Dichlormethan oder Chloroform, oder in einem niederen Ether, z. B. Diethylether, Diisopropylether, tert.-Butylmethylether oder Tetrahydrofuran, oder in einem niederen Keton, z. B. Aceton oder Methyl-

ethylketon, versetzt, die Mischung ggf. konzentriert, das ausfallende Salz abtrennt, ggf. umfällt und/oder umkristallisiert und im Vakuum trocknet. Man erhält kristalline oder amorphe pulverförmige Ammoniumsalze des Hyperforins / Adhyperforins bzw. eines Gemisches derselben.

Für dieses Verfahren besonders geeignete salzbildende Amine sind cycloaliphatische (z. B. Dicyclohexylamin), araliphatische (z.B. Benzylamin und dessen methoxy-substituierte Derivate), heterocyclische oder heteroaromatische Amine (z. B. 4-Aminopyridin).

Hyperforin / Adhyperforin können aus den kristallinen und lagerstabilen Salzen, durch Ansäuern, vorzugsweise mit einer organischen Säure (z. B. Citronensäure oder Weinsäure), und nachfolgender Verteilung zwischen einem der angeführten Lösungsmittel und Wasser bequem in reiner Form erhalten und als solche weiterverwendet bzw. in andere gewünschte Salze übergeführt werden. Hierzu wird das Hyperforin-Salz unter Schutzgas-Atmosphäre und Lichtausschluss in dem gewünschten Lösungsmittel (z. B. Methyltert.butylether oder Ethylacetat) gelöst oder suspendiert, mit der mindestens äquimolaren Menge der in Wasser gelösten Säure versetzt, bis zur völligen Auflösung gerührt, die Wasserphase abgetrennt und die organische Phase nach Waschen mit Wasser schonend evaporiert.

Arzneimittel:

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Arzneimittel, die neben nichttoxischen, inerten pharmazeutisch geeigneten Trägerstoffen eines oder mehrere der erfindungsgemässen Hyperforin- und/oder Adhyperforin-Salze enthalten oder die aus einem oder mehreren der erfindungsgemässen Hyperforin- und/oder Adhyperforin-Salze bestehen, sowie Verfahren zur Herstellung dieser Arzneimittel.

Unter nichttoxischen, inerten pharmazeutisch geeigneten Trägerstoffen sind feste, halbfeste oder flüssige Verdünnungsmittel, Füllstoffe und Formulierungshilfsmittel jeder Art zu verstehen.

Geeignete feste oder flüssige galenische Zubereitungsformen der erfindungsgemässen Arzneimittel sind z. B. Tabletten, Kapseln, Dragees, Suppositorien, Sirupe, Emulsionen, Suspensionen, Tropfen oder injizierbare Lösungen sowie Präparate mit protrahierter Wirkstoff-Freigabe.

Als Trägerstoffe bzw. Verdünnungsmittel seien z.B. verschiedene Zucker- oder Stärkearten, Cellulosederivate, Magnesiumcarbonat, Gelatine, tierische und pflanzliche Öle, Polyethylenglykole, Wasser oder andere physiologisch verträgliche Lösungsmittel sowie wasserhaltige Puffermittel, die durch Zusatz von Salzen oder Glukose isotonisch gemacht werden können, genannt. Ausserdem können gegebenenfalls oberflächenaktive Mittel, Farb- und Geschmacksstoffe, Stabilisatoren und Konservierungsmittel als weitere Zusatzstoffe in den erfindungsgemässen Arzneimitteln Verwendung finden.

Die therapeutisch wirksamen Verbindungen sind in den oben angeführten Arzneimitteln vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 0.5 bis 95 % der Gesamtmischung vorhanden.

Die Herstellung der Arzneimittel erfolgt nach dem Fachmann geläufigen Methoden, z.B. durch Mischen des oder der Wirkstoffe mit den Träger- und Zusatzstoffen und Weiterverarbeitung zu der gewünschten galenischen Form.

Die Erfindung betrifft des weiteren auch die Verwendung der erfindungsgemässen Wirkstoffe sowie der aus ihnen hergestellten Arzneimittel in der Humanmedizin zur Therapie oder zur Prophylaxe der Alzheimerschen Krankheit.

Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung der als Inhaltsstoffe von therapeutisch genutzten Extrakten bekannten Stoffe Hyperforin und/oder Adhyperforin, gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel, in der Humanmedizin zur Therapie oder zur Prophylaxe der Alzheimerschen Krankheit (2. medizinische Indikation).

Die erfindungsgemässen Wirkstoffe oder Arzneimittel können oral, parenteral, intravenös und/oder rektal appliziert werden. Die Dosierung der Wirkstoffe in der Humanmedizin erfolgt vorzugs-

weise in Gesamtmengen von 0.01 bis 10, insbesondere 0.05 bis 5 mg/kg Körpergewicht je 24 Stunden, gegebenenfalls in Form mehrerer Einzelgaben. Die Gesamtmenge wird in 1 bis 5, vorzugsweise in 1 bis 3 Einzeldosen verabreicht. Die Festlegung und die zeitliche Abfolge der Dosierung sowie die Wahl der geeigneten Applikationsart kann durch jeden Fachmann aufgrund seines Fachwissens leicht erfolgen.

Folgende Beispiele sollen die Erfindung erläutern, ohne sie in ihrem Umfang einzuschränken.

Allgemeines: Schmelzpunkte wurden mit den Geräten Elektrophthal® oder B-545 (Büchi) gemessen, IR-Spektren wurden mit dem IR-Spektrometer IFS 28 (Bruker) an KBr-Presslingen, NMR-Spektren mit dem AC 200 oder Avance 200 (Bruker) in D₄-Methanol aufgenommen (200 MHz für ¹H und 50 MHz für ¹³C; δ -Werte in ppm).

HPLC-Bestimmungen wurden mit dem Dynamax PDA-1 von Rainin, Voburn, MA, USA durchgeführt.

HPLC-Bedingungen (isokratisch): Adsorbens: Eurospher 100-C18, 10 μ m. Eluens: Acetonitril/Wasser/Phosphorsäure = 85/15/0.3

(Vol/Vol). Detektion: 273 nm. Referenzstandard: Hyperforin-Dicyclohexylamin-Salz gemäss Beispiel 2b = 100 %.

Assay: Gehaltsangaben in area-% bezüglich Referenzstandard. Bei Gehaltsangaben für Hyperforin (Adhyperforin) in deren Salzen sind die Werte stets in Prozent des als 100 % gesetzten stöchiometrischen Anteils des Hyperforins (Adhyperforins) angegeben.

Lösungsmittel: Methanol (p.a. oder reinst), Methyl-tert.butylether (> 99 %), Isopropanol (> 99 %) und Wasser (bidestilliert) werden vor Gebrauch entgast.

Arbeitsbedingungen: unter Rotlicht oder in abgedunkelten Apparaturen unter Schutzgas (Stickstoff oder Argon).

Elementaranalysen: lyophilisierte Produkte enthalten gelegentlich noch Restwasser. Sie werden als Hydrate berechnet.

Abkürzungen: MTBE = Methyl-tert.butylether. "98H/I" = n-Heptan / Isopropanol 98/2 (Vol/Vol). Fp = Schmelzpunkt.

wfr = wasserfrei. Th =Theorie. ss = sehr stark.

Beispiel Nr. 1a (Methode A): Natrium-Salz des Hyperforins.
23 mg (1 mmol) Natrium werden in 50 ml wfr. Methanol gelöst. In dieser Lösung werden 536 mg (1 mmol) Hyperforin unter Rühren aufgelöst und die Lösung evaporiert. Der Rückstand wird in 100 ml Wasser gelöst und lyophilisiert. Ausbeute: 556 mg helles Pulver (99.6 % der Th.). Fp: Zersetzung ab 170°C. IR: 1420-1500 cm^{-1} (ss).

Beispiel Nr. 1b (Methode A): Natrium-Salz des Hyperforins.
728.5 mg (1.31 mmol) 96.5 %-iges Hyperforin werden in 80 ml Methanol gelöst, mit 5.1 ml (1.32 mmol) 0.259-molarer methanolischer Natriumhydroxid-Lösung versetzt, kurz stehen gelassen und die Lösung bei 50°C evaporiert. Der Rückstand wird in Wasser gelöst und lyophilisiert. Ausbeute: 746.7 mg (1.33 mmol) weisses Pulver (101 % der Th.). Fp: Sintern zwischen 90°C und 110°C, Zersetzung bei 170°C. IR: 1499 cm^{-1} (ss, breit). ^1H -NMR: keine Verunreinigungen ausser ca. 1.4 Mol% (0.08 Gew.%) Methanol sichtbar. $\text{C}_{35}\text{H}_{51}\text{NaO}_4$ (558.78). Berechnet/Gefunden: C (75.23/71.61), H (9.20/8.87); Na (4.11/4.6). Hyperforin-Gehalt (HPLC): 86.5 %.

Beispiel Nr. 2a (Methode B): N.N-Dicyclohexylamin-Salz des Hyperforins.
1 g (1.86 mmol) Hyperforin wird in 50 ml n-Pentan/Methanol 98/2 Vol/Vol gelöst, darauf mit 445 μl (2.33 mmol) Dicyclohexylamin versetzt und 10 Stdn. bei 4°C stehen gelassen. Ausgefallenes Produkt wird über eine Glasfilterfritte abgesaugt, mit Pentan gewaschen und bei Raumtemperatur im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 652 mg weisses Pulver (48.7 % der Th.). Fp: 157.2°C. IR: 1473, 1489 cm^{-1} (ss). $\text{C}_{47}\text{H}_{75}\text{NO}_4$ (718.13). Berechnet/Gefunden: C (78.61/76.91), H (10.53/10.42), N (1.95/1.70). NMR: ausser den Signalen des Hyperforins sind folgende Signale des Dicyclohexylamins sichtbar: ^1H -NMR: 3.15 (m; 2 H; 1-CH) und (z.T. überlagert) 1.85-2.08 (m, 2- und 6- CH_2), 1.42 (quint, 3-, 4- und 5- CH_2). Quotient Dicyclohexylamin/Hyperforin = 1/1. Keine Verunreinigungen sichtbar. ^{13}C -NMR: 54.65 (1-CH), 30.76 (2- und 6- CH_2), 26.06 (4- CH_2) und 25.64 (3- und 5- CH_2).

Die Substanz wird aus Pentan/Methanol umkristallisiert. Fp: 163.9°C. $C_{47}H_{75}NO_4$ (718.13). Berechnet/Gefunden: C (78.61/78.92), H (10.53/10.44), N (1.95/1.79). Hyperforin-Gehalt (HPLC): 100 %.

Beispiel Nr. 2b (Methode B): N.N-Dicyclohexylamin-Salz des Hyperforins.

1.547 g (2.82 mmol) 98 %-iges Hyperforin werden in 60 ml n-Heptan/Isopropanol 98/2 Vol/Vol gelöst, darauf mit 600 µl (3.0 mmol) Dicyclohexylamin versetzt und 18 Std. unter N_2 bei Raumtemperatur stehen gelassen. Ausgefallenes Produkt wird über eine Glasfilterfritte abgesaugt, mit Heptan gewaschen und 8 Std. bei Raumtemperatur im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 1.767 g (2.46 mmol) weisses Pulver (87 % der Th.). Fp: 159.7°C. IR: 1473, 1489 cm^{-1} (ss). 1H -NMR: entspricht dem 1H -NMR-Spektrum von Beispiel 2a. $C_{47}H_{75}NO_4$ (718.13). Berechnet/Gefunden: C (78.61/78.59), H (10.53/10.66), N (1.95/1.87). Hyperforin-Gehalt (Titration mit $HClO_4$): 100 %.

Beispiel Nr. 3a (Methode B): 3.4.5-Trimethoxybenzylamin-Salz des Hyperforins.

57.8 g (0.1 mmol) 93.5 %-iges Hyperforin werden in 2 ml n-Pentan gelöst und sofort mit 50 µl einer 2M-Lösung von 3.4.5-Trimethoxybenzylamin in MTBE versetzt. Der farblose Niederschlag wird abgesaugt, mit Pentan gewaschen und bei Raumtemperatur im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 10 mg weisses Kristallinat (14 % der Th.). IR: 1480 cm^{-1} (ss). $C_{45}H_{67}NO_7$ (734.04).

Beispiel Nr. 3b (Methode C): 3.4.5-Trimethoxybenzylamin-Salz des Hyperforins.

58.3 mg (0.1 mmol) 92.7 %-iges Hyperforin werden in 2 ml wfr. Methanol gelöst. mit 19.7 mg (0.1 mmol) frisch destilliertem 3.4.5-Trimethoxybenzylamin versetzt, mit 2 ml Methanol verdünnt und bei 50°C evaporiert. Das Evaporat wird in 20 ml Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Ausbeute: 70.4 mg weisses Pulver (96 % der Th.). Fp: 126-33°C. IR: 1484 cm^{-1} (ss). $C_{45}H_{67}NO_7$ (734.04). Hyperforin-Gehalt (HPLC): 87.2%.

Beispiel Nr. 4 (Methode D): L-Arginin-Salz des Hyperforins.
58.3 mg (0.1 mmol) 92.7 %-iges Hyperforin werden in 2 ml wfr. Methanol gelöst, mit der Lösung von 17.4 mg (0.1 mmol) L-Arginin in 0.5 ml bidest. Wasser und 15 ml Methanol versetzt und bei 50°C im Vakuum konzentriert. Der Rückstand wird mit 10 ml Wasser verdünnt und lyophilisiert. Ausbeute: 58.1 mg weisses Pulver (81.7 % der Th.). Fp: Sintern ab 110°C, Zersetzung bei 145°C. IR: 1486 cm⁻¹ (ss). C₄₁H₆₆NO₆ (711.01). Hyperforin-Gehalt (HPLC): 82.7 %.

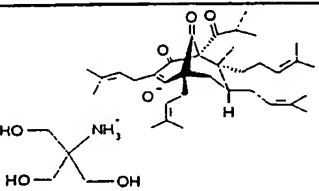
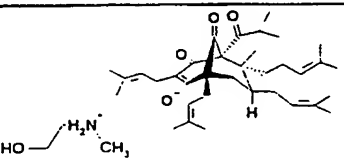
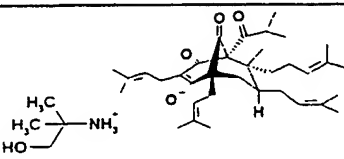
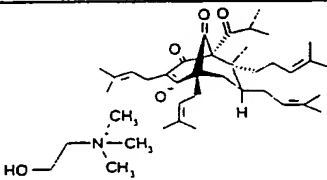
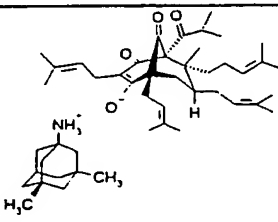
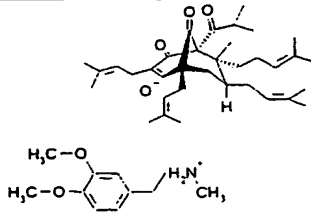
Beispiel Nr. 5 (Methode B): Pyrrolidin-Salz des Hyperforins.
578 mg (1.0 mmol) 93.5 %-iges Hyperforin werden in 15 ml n-Pentan gelöst, darauf mit 85 µl (1.0 mmol) Pyrrolidin versetzt und 24 Std. bei Raumtemperatur (keine Kristallisation) und 24 h bei -20°C stehen gelassen (Produkt fällt ölig aus). Das Gemisch wird evaporiert, das Evaporat in Wasser/Methanol gelöst und lyophilisiert. Ausbeute: 576 mg (0.947 mmol) farbloses Pulver (94.7 % der Th.). IR: 1489 cm⁻¹ (ss). C₃₉H₆₁NO₄ (607.93). Hyperforin-Gehalt (HPLC): 93.7 %.

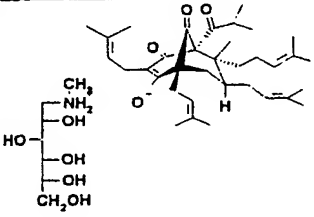
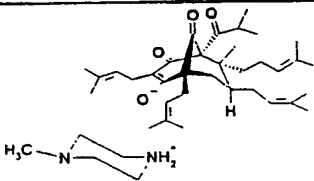
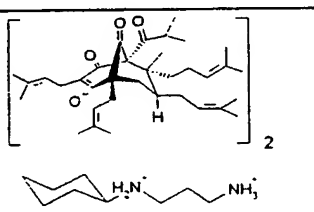
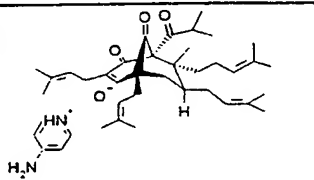
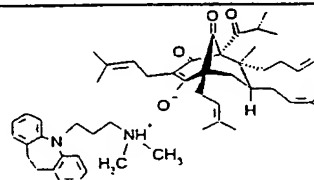
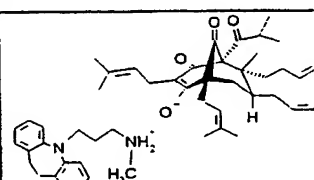
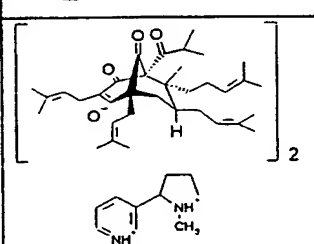
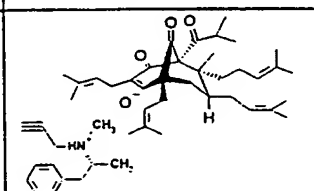
Beispiel Nr. 6 (Methode D): Ethylendiamin-Salz mit 2 Mol Hyperforin.
58.3 mg (0.1 mmol) 92.7 %-iges Hyperforin werden in 2 ml Methanol gelöst, mit 50 µl einer 1M-Lösung von Ethylendiamin in Wasser und 2 ml Methanol versetzt und bei 50°C im Vakuum konzentriert. Der Rückstand wird mit 20 ml Wasser verdünnt und lyophilisiert. Ausbeute: 57.1 mg weisses Pulver (100.7 % der Th.). Fp: (Sintern ab 40°C) 50-2°C. IR: 1480 cm⁻¹ (ss). C₇₂H₁₁₂N₂O₈ (1133.70). Hyperforin-Gehalt (HPLC): 83.1 %.

Beispiele Nr. 7 bis 20

Weitere Beispiele für erfindungsgemässe Salze des Hyperforins sind in der nachstehende Tabelle Nr. I aufgeführt. Die Salze liegen nach dem Lyophilisieren als farblose bis cremefarbene Pulver vor. Ihre Konstitution wird NMR- und IR-spektroskopisch bestätigt.

Tabelle Nr. I

Nr.	Struktur	Salzbildner	Me- tho- de	Aus- beu- te [%]	Schmelz- bereich [°C]	IR [cm ⁻¹]	Hyper- forin- gehalt HPLC [% der Th.]
7		Tris- (hydroxy- methyl)- aminomethan	D	88	37-53	1489 ss	90.4
8		2-Methyl- amino- ethanol	D	101	42-50	1491 ss	85.3
9		2-Amino-2- methyl- propanol	D	100	72-5	1487 ss	86.1
10		Cholin	C	100	58-61	1505 ss	78.7
11		1-Amino- 3,5-dime- thyl-ada- mantan (Memantin)	C	100	62-70	1487 ss	88.8
12		N-Methyl- homo-vera- trylamin	C	100	47-57	1491 ss	75.0

13		N-Methyl-D-glucamin (Meglumine)	D	100	48-68	1493 s	76.4
14		1-Methyl-piperazin	D	95	57-62	1491 ss	92.9
15		N-(3-amino-propyl)-N-cyclo-hexylamin (APCHA)	D	100	55-8	1486 ss	90.8
16		4-Amino-pyridin	D	92.7	80-2	1486 ss	94.6
17		Imipramin	C	100	45-60	1489 s, 1500 s	90.5
18		Desipramin	C	100	69-75	1489 ss	90.9
19		Nicotin	D	97.5	48-50	1492 s	94.9
20		Selegelin (Deprenyl)	C	74	37-47	1495 m	110.2

Beispiel Nr. 21: Isolierung von Hyperforin/Adhyperforin aus einem Hypericum-CO₂-Extrakt (Gehalt: 32.1 % Hyperforin, 6.8 % Adhyperforin) durch Fällung als N,N-Dicyclohexylamin-Salz und Umkristallisation.

a) 200 g Extrakt (145 mmol Hyperforin + Adhyperforin) werden mit 2.8 L n-Heptan/Isopropanol 98/2 ("98H/I") bei 40°C im Rotationskolben extrahiert, 200 g wfr. Natriumsulfat zugesetzt, 30 min gerührt, vom Ungelösten abfiltriert (Super Seitz 1500 Filterplatte) und mit 200 ml "98H/I" nachgewaschen. Unter Rühren werden dem Filtrat 29 g (160 mmol) Dicyclohexylamin zugetropft und die Mischung 16 h bei 20°C stehen gelassen. Das Kristallisat wird abgesaugt, mit "98H/I" gewaschen und im Vakuum getrocknet (K1: 55.76 g). Die Mutterlauge wird auf 1/3 Vol eingeeengt, 16 h bei 20°C gelagert und auf 4°C gekühlt. Vom Kristallisat wird der Überstand abdekantiert, das Kristallisat mit "98H/I" gewaschen und getrocknet (K2: 37.95 g).

Das Rohkristallisat (K1 + K2: 93.71 g; HPLC-Gehalt: 67.2 % Hyperforin, 14.1 % Adhyperforin) wird unter Erwärmen in 400 ml Methanol (reinst) gelöst, 4 h bei 4°C gelagert, ausgefallenes wachsartiges Material abgesaugt, das Filtrat eingeeengt, in 200 ml MTBE gelöst, mit 300 ml n-Pentan versetzt, 16 h bei 20°C gelagert und auf 4°C abgekühlt. Das Kristallisat wird abgesaugt, 2 x mit kaltem MTBE/Pentan gewaschen, im Vakuum (ca. 20 hPa) vorgetrocknet und bei 60°C / 0.1 hPa nachgetrocknet [46.37 g K3; Fp: 161.6 - 162.0°C. HPLC-Gehalt: 84.9 % Hyperforin, 17.5 % Adhyperforin]. Die Mutterlauge wird auf 2/3 Vol konzentriert, w. o. gelagert, das Kristallisat abgesaugt, w. o. gewaschen und getrocknet [30.92 g K4]; Fp: 158.8 - 159.2°C. HPLC-Gehalt: 78.9 % Hyperforin, 19.2 % Adhyperforin].

Gesamtausbeute: 77.29 g Dicyclohexylamin-Salz von Hyperforin/Adhyperforin (ca. 82/18) = ca. 74 %.

b) 1000 g Extrakt (725 mmol Hyperforin + Adhyperforin) werden in 15 L Methanol 15 min bei 22-29 °C mit einem Ultra-Turax dispergiert, 17 h bei 4 °C gelagert und ausgefallene Wachse über einen Seitz-Supra-2600 Einschiebfilter abfiltriert. Der Filterkuchen wird mit 1 L Methanol gewaschen und die vereinten Filtrate bei 40°C im Vakuum auf ca. 1/3 Vol konzentriert. Das auf 20 °C abgekühlte Konzentrat wird mit Heptan gesättigt, mit 3 x 2 L

methanolgesättigtem Heptan extrahiert und die vereinten Extrakte mit 2 x 500 ml heptangesättigtem Methanol reextrahiert. Die vereinten Methanolextrakte werden bei 40 °C evaporiert, danach in 8 L "98H/I" bei 40 °C unter Rotation gelöst, auf 20 °C gekühlt, unter Rühren, Lichtschutz und Argon mit 159 ml (798 mmol) Dicyclohexylamin versetzt und die sofort kristallisierende Mischung 16 h bei 4 °C gelagert. Das Kristallisat wird abgesaugt, mit kaltem "98H/I" gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Trockenprodukt (425 g) wird in 1.5 L MTBE suspendiert, 5 min bei 40 °C gerührt, nach Abkühlen auf 20 °C das Kristallisat abgesaugt, mit kaltem MTBE gewaschen und 24 h bei 20 °C / 10 hPa getrocknet. Ausbeute: 355.0 g (494 mmol) = 68.2 %. Fp: 161.0°C. HPLC-Gehalt: 82.44 % Hyperforin, 17.39 % Adhyperforin, zusammen 99.83 %.

Beispiel Nr. 22: Salz von Adhyperforin mit Dicyclohexylamin. Aus einem Anteil des Hyperforin/ Adhyperforin-Dicyclohexylamin-Salzes (K4 des Beispiels 21) wird mittels präparativer HPLC an RP-18 Adsorbens das Adhyperforin isoliert (HPLC-Gehalt: 93.8 %). Hiervon werden 34 mg (62 µmol) in 2 ml "98H/I" unter N₂ und Lichtausschluss gelöst, 12.5 µl (63 µmol) Dicyclohexylamin zudosiert, nach 18 h das Kristallisat abgesaugt, mit kaltem "98H/I" gewaschen und 18 h im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 12.5 mg (17 µmol) = 27 %. HPLC-Gehalt: 91.2 % Adhyperforin.

Beispiel Nr. 23: Freisetzung von Hyperforin/Adhyperforin aus einem Dicyclohexylamin-Salz von Hyperforin/Adhyperforin (HPLC-Gehalt: 86 % Hyperforin, 15 % Adhyperforin). Unter Rühren werden 718 mg (1.0 mmol) Hyperforin/Adhyperforin-Dicyclohexylamin-Salz in 60 ml MTBE suspendiert, 10 ml 1-molarer wässriger Citronensäure zugegeben, 30 min gerührt, die MTBE-Phase abgetrennt, 3 x mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und evaporiert. Das farblose Öl wird bei 20 °C / 0.1 hPa getrocknet. Ausbeute: 527.6 mg (0.983 mmol) = 98.3 %. HPLC-Gehalt: 86.8 % Hyperforin, 14.9 % Adhyperforin.

Beispiel Nr. 24: Kalium-Salz von Hyperforin/Adhyperforin. 537 mg (1.0 mmol) Hyperforin/Adhyperforin-9/1-Gemisch werden in 100 ml Methanol gelöst, mit 10 ml einer 0.1M-KOH in Methanol versetzt und evaporiert. Der Rückstand wird in 80 ml Wasser aufgenommen

und lyophilisiert. Ausbeute: 590.6 mg (99.6 mmol) = 99.6 % farbloses Pulver. Fp: 110-120 °C (Sintern). HPLC-Gehalt: 78.7 % Hyperforin, 8.8 % Adhyperforin. IR: 1499.5 cm⁻¹ (ss). C₃₅H₅₁KO₄ x H₂O(592.91).

Beispiel Nr. 25: Lithium-Salz von Hyperforin/Adhyperforin. 2.68 g (5.0 mmol) Hyperforin/Adhyperforin-5/1-Gemisch werden in 50 ml Methanol gelöst, mit der Lösung von 0.210 (5.0 mmol) Lithiumhydroxid-Hydrat in 20 ml Methanol versetzt, das Gemisch bei 40 °C evaporiert, der Rückstand in 30 ml Wasser gelöst und lyophilisiert. Ausbeute: 2.735 g (4.88 mmol) = 97.5 % farbloses Pulver. Schmelzbereich: 80-93 °C. HPLC-Gehalt: 80.2 % Hyperforin, 15.0 % Adhyperforin; zusammen 95.2 %. IR: 1493.1 cm⁻¹ (ss). C₃₅H₅₁LiO₄ x H₂O(560.74).

Beispiel Nr. 26: L-Lysin-Salz von Hyperforin/Adhyperforin. 2.68 g (5.0 mmol) Hyperforin/Adhyperforin-5/1-Gemisch werden in 50 ml Methanol gelöst, unter Rühren mit der Lösung von 0.731 g (5.0 mmol) L-Lysin in 10 ml Wasser versetzt und das klare Gemisch bei 40 °C evaporiert. Der Rückstand wird nach Zugabe von 50 ml Wasser lyophilisiert. Ausbeute: 3.35 g (4.78 mmol) = 95.6 % farbloses Pulver. Schmelzbereich: 74-98 °C. HPLC-Gehalt: 83.25 % Hyperforin, 16.98 % Adhyperforin, zusammen 100.2 %. IR: 1483 cm⁻¹ (ss). C₄₁H₆₆N₂O₆ x H₂O (701.07).

Beispiel Nr. 27: Pindolol-Salz von Hyperforin/Adhyperforin. 2.68 g (5.0 mmol) Hyperforin/Adhyperforin-8/1-Gemisch und 1.24 g (5.0 mmol) Pindolol werden in 50 ml Methanol gelöst und bei 40 °C evaporiert. Der Rückstand wird nach Zugabe von 50 ml Wasser lyophilisiert. Ausbeute: 4.03 g (5.1 mmol) = 102 % weisser Schaum. Schmelzbereich: 65-75 °C. HPLC-Gehalt: 91.2 % Hyperforin, 11.7 % Adhyperforin, zusammen 102.9 %. C₄₉H₇₂N₂O₆ (701.07).

Beispiel Nr. 28: Pyrrolidin-Salz von Hyperforin/Adhyperforin. 531 mg (0.99 mmol) Hyperforin/Adhyperforin-5/1-Gemisch wird unter Lichtausschluss in 10 ml Methanol gelöst, darauf mit 83.5 µl (0.98 mmol) Pyrrolidin versetzt und am Rotverdampfer konzen-

triert. Das Konzentrat wird in 70 ml Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Ausbeute: 570.6 mg (0.938 mmol) = 95%. Schmelzbereich: 50-70 °C. HPLC-Gehalt: 79.5 % Hyperforin, 16.4 % Adhyperforin, zusammen 95.9 %. IR: 1489 cm^{-1} (ss). $\text{C}_{39}\text{H}_{61}\text{NO}_4$ (607.93).

Beispiel Nr. 29: Desipramin-Salz von Hyperforin/Adhyperforin. 2.68 g (5.0 mmol) Hyperforin/Adhyperforin-5/1-Gemisch werden unter N_2 und Lichtausschluss in MTBE/Pentan 9/1 in der Wärme unter Zugabe einiger Tropfen Methanol gelöst und dann bei -20 °C kristallisiert. Das Kristallisat wird abgesaugt, mit eiskaltem Pentan/MTBE 9/1 gewaschen und bei RT / 0.1 hPa getrocknet. Ausbeute: 4.03 g (5.0 mmol) = 100 % weisses Kristallpulver. Fp: 154.8-155.3 °C. HPLC-Gehalt: 82.4 % Hyperforin, 16.3 % Adhyperforin, zusammen 98.7 %. IR: 1489 cm^{-1} (ss). $\text{C}_{53}\text{H}_{74}\text{N}_2\text{O}_4$ (803.19).

Beispiel Nr. 30: Natrium-Salz von Hyperforin/Adhyperforin. 5.94 g (11.1 mmol) Hyperforin/Adhyperforin-9/1-Gemisch werden unter N_2 und Lichtausschluss in 50 ml Methanol gelöst, mit 10.7 ml 1M-NaOH versetzt und das Methanol am Rotationsverdampfer bei 40 °C im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wird mit 50 ml Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Ausbeute: 6.2 g (11.1 mmol) = 97.2 % weisses Pulver. Schmelzbereich: 109-128 °C. HPLC-Gehalt: 91.3 % Hyperforin, 9.5 % Adhyperforin; zusammen 100.8 % der Theorie. IR: 1499 cm^{-1} (ss). $\text{C}_{35}\text{H}_{51}\text{NaO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$. (576.80).

Beispiel Nr. 31: L-Arginin-Salz von Hyperforin/Adhyperforin. 2.68 g (5.0 mmol) Hyperforin/Adhyperforin-5/1-Gemisch werden unter N_2 und Lichtausschluss in 50 ml Methanol gelöst, mit der Lösung von 0.87 g (1.0 mmol) L-Arginin in 10 ml Wasser versetzt und bei 50°C im Vakuum konzentriert. Der Rückstand wird mit 50 ml Wasser verdünnt und lyophilisiert. Ausbeute: 3.59 g (4.92 mmol) = 98.5 % weisses Pulver. Schmelzbereich: 115-133°C. IR: 1486 cm^{-1} (ss). HPLC-Gehalt: 82.6 % Hyperforin, 17.0 % Adhyperforin; zusammen 99.6 %. $\text{C}_{41}\text{H}_{66}\text{NO}_6 \times \text{H}_2\text{O}$ (729.02).

Beispiel Nr. 32: Stabilität von Hyperforin-Salzen.
Proben von Hyperforinsalzen werden in mit einem Schnappdeckel-
verschluss versehenen Braunglasflaschen ohne Schutzgas bei
Raumtemperatur gelagert und der Gehalt an Hyperforin (Beispiele
1 bis 20) bzw. an Hyperforin + Adhyperforin (Beispiele 21 bis
31) mittels HPLC (area%) zu den Lagerzeiten 0, 1 Woche, 4 Wochen
und 12 Wochen bestimmt. Die Änderung des Gehalts an Hyperforin
(+ Adhyperforin) sind in Tabelle Nr. II dargestellt.

Tabelle Nr. II: Stabilität von Hyperforin-Salzen

Substanz gemäß Bei- spiel Nr.	Änderung des Gehalts an Hyperforin (% des stöchiometrischen Gehalts)				Anmerkungen
	Ausgangswert [%]	Differenz nach 1 Woche [%]	Differenz nach 4 Wochen [%]	Differenz nach 12 Wochen [%]	
1	85.9		-0.4	-2.3	
2	100 (titr.) ¹⁾		±0.0 . (titr.) ¹⁾		Referenz- standard für HPLC
3	87.2	+1.1	-1.1	-5.0	
4	82.7	-0.9	-2.8	-6.0	
5	93.7	-0.5	±0.0	-3.2	
6	83.1	-4.8			
7	90.4	-3.1			
8	85.3	+1.2	-6.0		
9	86.1	+1.8	-4.1	-9.5	
10	78.7	-3.3	-8.8		
11	88.8	-0.9	-3.0	-11.5	
12	75.0	+0.3	-5.3	-5.6	
13	76.4	+0.9	-1.6	-2.8	
14	92.9	-0.5	-4.5	-10.4	
15	90.8	-2.0	-2.0	-9.9	
16	94.6	+1.4	+0.1	±0.0	
17	90.5	-0.8	-5.6	-12.6	
18	90.9	+1.5	+2.1	-2.6	
21	98.4		-0.9	-1.5**	** 8 Wochen
25	93.2		-3.7		
26	97.7	+0.2	-2.7	-5.1	
27	102.9	+0.5	-0.8	-0.2	
28	95.9	-0.7	-1.1	-4.7	
29	98.7	+0.9	+1.3	+1.0	
30	98.6		-0.4		
freies Hyperforin	91.5	-17.9	-24.25	-28.4	Vergleich

1) Dieses Salz wird als Referenzstandard verwendet. Der Gehalt an Hyperforin (in % des berechneten stöchiometr. Werts) wurde mittels Perchlorsäure-Titration bestimmt.

Die gefundenen Werte belegen die erhöhte Stabilität und verbesserte Lagerfähigkeit der Hyperforin-Salze im Vergleich zum freien Hyperforin.

Beispiel Nr. 33: Aktivierung der Proteinkinase PKC γ durch Hyperforin und dessen Salze.

Aktivatoren der PKC- γ sind potentiell geeignet, die α -Sekretase zu aktivieren. Solche Aktivatoren werden in Enzymtests gefunden, bei denen rekombinant produzierte PKC- γ suboptimal aktiv ist. Die Testmedien waren:

HEPES-NaOH	50 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1,25 mM
MgCl ₂	5 mM
DTT	1mM
ATP	0,1 μ M
Histon III-S	100 μ g/ml
rekombinante PKC- γ	200-100 ng/well
CaCl ₂	1,32 mM

In der nachfolgenden Tabelle Nr. III sind die Aktivitätssteigerungen der rekombinanten PKC- γ durch Hyperforin und dessen Salze in verschiedenen Konzentrationen aufgeführt.

Tabelle Nr. III: Aktivierung der Proteinkinase PKC- γ

Beispiel Nr.	Aktivitätssteigerung der PKC- γ [%] bei der Substanz-Dosis:		
	10 $\mu\text{g/ml}$	3 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
Hyperforin	45	51	6
1	56	30	9
5	48	20	3
21	56	22	-9
24	21	24	7
25	45		12
26	43	20	10
27	34	18	6
31	24	7	5
1 % DMSO	6	5	4

In der Tabelle wurde die Kontrolle mit 100 nM Phorbol-12-myristat-13-acetat (TPA; Stimulator der PKC- γ) zu 100 % gesetzt.

Die ermittelten Werte zeigen einen deutlichen Anstieg der PKC- γ -Aktivität bei Zusatz von Hyperforin oder dessen Salzen zum Testmedium.

Beispiel Nr. 34: Aktivierung der α -Sekretase durch Hyperforin und dessen Salze.

Um die α -Sekretaseaktivität in einem zellulären Testsystem unabhängig von der β - und γ -Sekretase nachweisen zu können, wurde ein Expressionsplasmid konstruiert, das aus DNA-Kassetten des APP (Alzheimer Precursor Protein), des APLP-2 (Alzheimer Precursor like Protein-2) sowie dem Reporterprotein Seap (Secreted alkaline phosphatase) zusammengesetzt ist (siehe Figur 1).

Da die APP Kasette in beiden Konstrukten mit Aminosäure 7 der β -Amyloid Sequenz beginnt, fehlt die Erkennungssequenz für die β -Sekretase in den Sec-Fusionsproteinen. Die Spaltung durch die γ -Sekretase ist für das humane APLP-2 nicht beschrieben, so daß die Spezifität der Fusionsproteine für lediglich die α -Sekre-

tase durch Austausch der Transmembrandomäne des APPs durch die des APLP-2, erreicht wird. Das Expressionsplasmid Seca1 wurde stabil in humane, neuronale Zellen SY5Y transfiziert. Aktivierung der α -Sekretase in diesen Seca1 transfizierten Zellen zeigt sich in einer vermehrten Abgabe der Seap in das Zellmedium. Die Seap Menge wird bestimmt und dient als Maß für die α -Sekretase-aktivität.

Testbedingungen: 80 000 FL-2a Zellen/well. V = 100 μ l. Inkubationszeit: 60 min. Konzentration der Substanzen: 10 μ g/ml. Mittelwerte +/- S.D. von Triplikaten.

In der nachfolgenden Tabelle Nr. IV sind die in relativen Light-Units (RLU) gemessenen Mengen der Secreted alkaline phosphatase (Seap) als Maß für die Stimulierung der α -Sekretase-Aktivität durch Hyperforin und dessen Salze aufgeführt

Tabelle Nr. IV: Aktivierung der α -Sekretase

Beispiel Nr.	Aktivität		Anmerkungen
	der α - Secretase [RLU]	S.D. [RLU]	
Hyperforin	441	55.1	
21	350	14.6	
24	445	67.1	
25	322	128.6	
26	423	34.4	
27	453	15.1	
28	457	42.9	
29	404	8.9	
30	419	41.9	
31	481	42.6	
DMSO	76	8.9	Lösungsmittel- Kontrolle
TPA	386	11.4	Positiv-Kontrolle

Als Positiv-Kontrolle wurde die Aktivierung der α -Sekretase durch den Phorbolester TPA (100 ng/ml) ermittelt.

Die ermittelten Werte zeigen eine starke Aktivierung der α -Secretase sowohl bei Zusatz von Hyperforin als auch dessen Salzen zum Testmedium.

PATENTANSPRÜCHE:

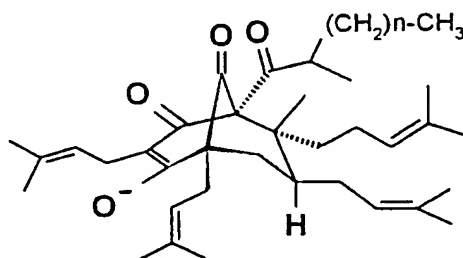
1. Salze des Hyperforins und Adhyperforins der allgemeinen Formel I



worin

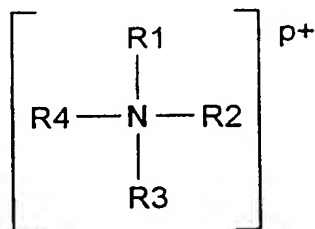
m eine ganze Zahl von 1 bis 3,

$[A^-]$ ein Anion der Formel II mit $n = 0$ oder 1



(II)

und $[B]P^+$ ein Alkalimetallion oder ein Ammoniumion einer salzbildenden Stickstoffbase der allgemeinen Formel III ist,



(III)

worin R1, R2 und R3

unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom, eine geradkettige oder verzweigte Alkyl-, Cycloalkyl-, Bicycloalkyl-, Tricycloalkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Heterocyclalkyl-, Aryl-, Heteroaryl, Arylalkyl- oder Heteroarylalkyl-Gruppe oder ein durch einen oder mehrere Hydroxy-, Alkoxy-, Aryloxy-, Alkanoyl-, Aroyl-, Carboxy-, Alkoxycarbonyl-, Amino-, Alkylamino-, Hydroxylamino-, Amido-, Carbamoyl-, Ureido-, Amidino-, Guanidino-, Cyano-, Azido-, Mercapto-, Alkylthio-, Alkylsulfoxy-, Alkylsulfonyl-, Alkylsulphenyl-, Aminosulfonyl-,

Fluor-, Chlor-, Brom-, Jod-, Alkyl- oder Perfluoralkyl-Rest(e) substituiertes Derivat der genannten Gruppen bedeuten,

oder worin R1 und R2

zusammen mit dem N-Atom einen Azetidin-, Pyrrolidin-, Pyrrolin-, Piperidin-, Piperazin-, Homopiperazin-, Morpholin-, Thio-morpholin-, Pyridin-, Di- oder Tetra-hydropyridin-, Pyrimidin-, Pyrazin-, Azepin-, Dihydroazepin-, Oxazepin-, Diazepin-, Imidazol-, Pyrazol-, Oxazol- oder Thiazol-Ring oder einen der genannten Ringe bedeuten, der ankondensierte aliphatische, heteroaliphatische, aromatische oder hetero-aromatische Ringe aufweist und/oder durch einen oder mehrere Hydroxy-, Alkoxy-, Aryloxy-, Alkanoyl-, Aroyl-, Carboxy-, Alkoxycarbonyl-, Amino-, Alkylamino-, Hydroxylamino-, Amido-, Carbamoyl-, Ureido-, Amidino-, Guanidino-, Cyano-, Azido-, Mercapto-, Alkylthio-, Alkylsulfoxy-, Alkylsulfonyl-, Alkylsulfenyl-, Aminosulfonyl-, Fluor-, Chlor-, Brom-, Jod-, Alkyl- oder Perfluoralkyl-Rest(e) substituiert ist,

und worin der Rest R4

ein Wasserstoffatom oder eine geradkettige oder verzweigte Alkylgruppe bedeutet,

wobei $p = m$ ist und die Gesamtanzahl positiver Ladungen des Rests [B] angibt.

2. Salze nach Anspruch 1, worin das Alkalimetallion ein Lithium-, Natrium- oder Kaliumion ist.

3. Salze nach Anspruch 1, worin die salzbildende Stickstoffbase ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus aliphatischen und cycloaliphatischen Aminen, durch eine oder mehrere Hydroxylgruppen substituierten aliphatischen und cycloaliphatischen Aminen, Polyaminen, cyclischen und heterocyclischen Aminen, durch eine oder mehrere Niederalkyl- oder Hydroxyl-Reste substituierten cyclischen oder heterocyclischen Aminen, unsubstituierten und substituierten aromatischen, heteroaromatischen, arylaliphatischen und heteroarylaliphatischen Aminen, Aminosäureestern und Aminosäureamiden.

4. Salze nach Anspruch 3, worin die salzbildende Stickstoffbase N,N-Dicyclohexylamin ist.

5. Salze nach Anspruch 1 oder 3, worin die salzbildende Stickstoffbase ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Wirkstoffen zur Therapie der Alzheimerschen Krankheit (AD), Wirkstoffen zur Therapie von Depressionen (Antidepressiva), Wirkstoffen zur Therapie von Angst- und Spannungszuständen (Anxiolytika), Calcium-antagonistisch wirkenden Stoffen mit basischer Seitenkette, Wirkstoffen zur Therapie von Dyspepsie, Prokinetika, β -Rezeptorenblocker und Nootropika.

6. Verfahren zur Herstellung der Salze des Hyperforins und Adhyperforins gemäss einem der Ansprüche 1 bis 5, bei dem Hyperforin und/oder Adhyperforin unter Inertgas in einem Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch, ausgewählt aus der aus C5- bis C8-Alkanen oder Cycloalkanen, niederen Chloralkanen, Alkoholen, Ketonen, Estern und Ethern bestehenden Gruppe, gelöst werden und mit der Lösung einer Alkalimetallbase oder einer salzbildenden Stickstoffbase in einem der vorgenannten Lösungsmittel oder in Wasser im gewünschten stöchiometrischen Verhältnis vereint werden, wonach man das gebildete Salz auskristallisieren läßt und abtrennt oder die vereinten Lösungen evaporiert und nach Zugabe von Wasser lyophilisiert.

7. Verfahren zur Anreicherung bzw. Reingewinnung von Hyperforin und Adhyperforin in Form der Salze gemäss einem der Ansprüche 1 bis 5 aus Johanniskraut-Extrakten, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Johanniskraut-Extrakt mit einem Gesamtgehalt an Hyperforin und Adhyperforin von 20-80 %, in einem geeigneten Lösungsmittel, das aus der aus apolaren C1-C10-Alkanen und -Cycloalkanen bestehenden Gruppe ausgewählt wird, löst und diese Lösung mit einer mindestens equimolaren Menge einer Alkalimetallbase oder einer salzbildenden Stickstoffbase oder einer Lösung einer solchen Base in einem der vorgenannten Lösungsmittel oder in einem C1-C4-Halogenalkan, Ether, Tetrahydrofuran oder Keton versetzt und das entstandene Salz abtrennt, reinigt und trocknet.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man als Base N,N-Dicyclohexylamin verwendet.
9. Verwendung von Salzen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 zur stabilen Lagerhaltung von Hyperforin, Adhyperforin und deren Gemischen.
10. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens ein Salz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5.
11. Verwendung von Hyperforin, Adhyperforin oder Gemischen daraus zur Herstellung von pharmazeutischen Zubereitungen bzw. Arzneimitteln zur Behandlung der Alzheimerschen Krankheit und der damit einhergehenden Symptome.
12. Arzneimittel, enthaltend Hyperforin, Adhyperforin oder Gemische daraus, zur Behandlung der Alzheimerschen Krankheit und der damit einhergehenden Symptome.

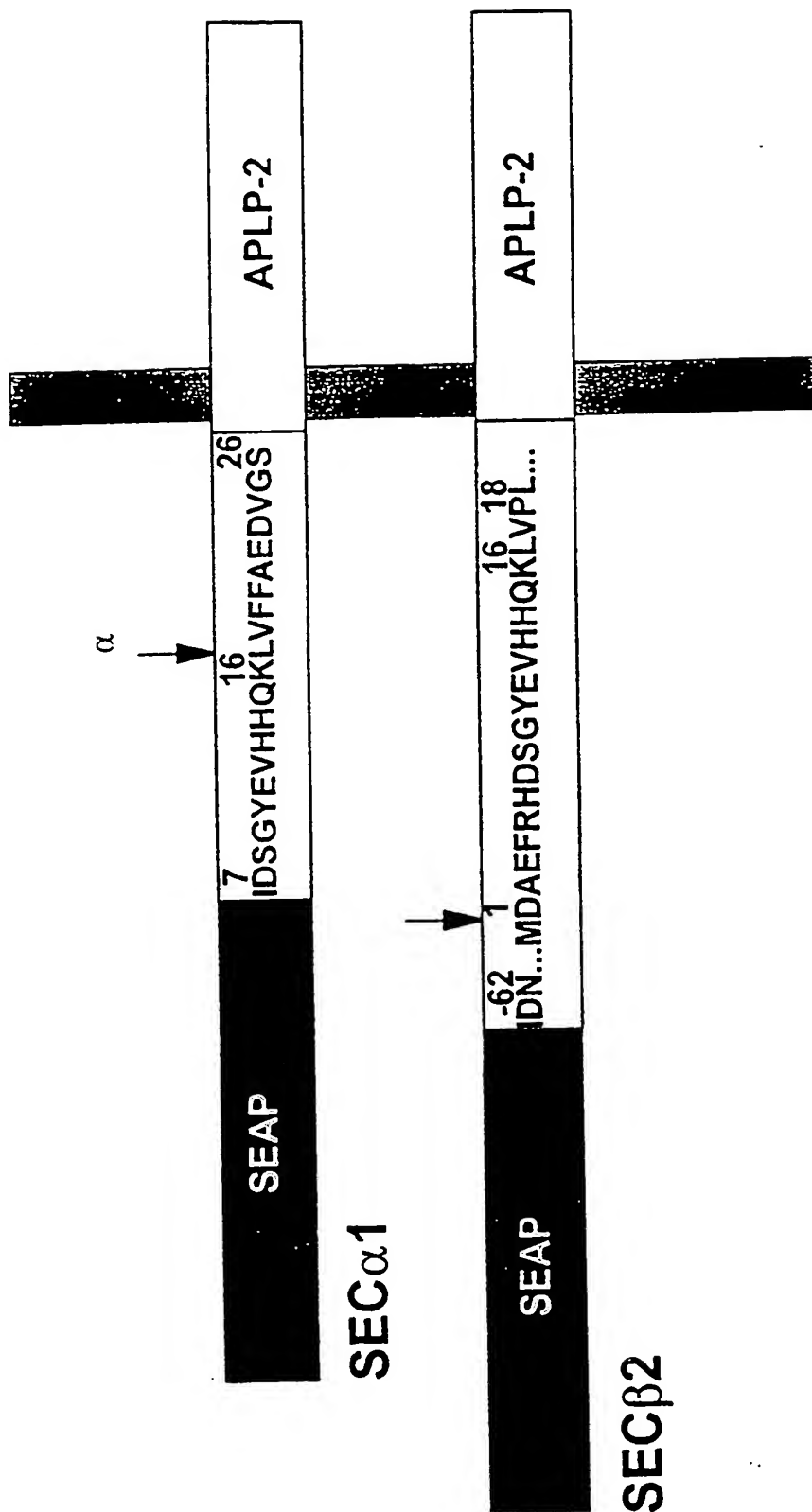


Fig. 1: Expressionsplasmid (Beispiel 34)

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/00737

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07C50/36 A61K35/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07C A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 599 307 A (SCHWABE WILLMAR GMBH & CO) 1 June 1994 cited in the application see claims 7,8 see page 3, line 1-45	12
X	WO 97 13489 A (SCHWABE WILLMAR GMBH & CO ;ERDELMEIER CLEMENS (DE); GRETHLEIN ECKH) 17 April 1997 see claim 15 see page 5, line 11-17	12

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 May 1999

Date of mailing of the international search report

19/05/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Goetz, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP99/00737

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0599307 A	01-06-1994	DE 4239959 A AT 170080 T DE 59308924 D ES 2121918 T	01-06-1994 15-09-1998 01-10-1998 16-12-1998
WO 9713489 A	17-04-1997	DE 19619512 C AT 174511 T AU 1589197 A CA 2233277 A CN 1198097 A DE 19646977 A DE 59601019 D EP 0854726 A ES 2118686 T JP 11500743 T NO 981352 A PL 328136 A	31-07-1997 15-01-1999 30-04-1997 17-04-1997 04-11-1997 15-01-1998 28-01-1999 29-07-1998 01-10-1998 19-01-1999 25-03-1998 18-01-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00737

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07C50/36 A61K35/78

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07C A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 599 307 A (SCHWABE WILLMAR GMBH & CO) 1. Juni 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche 7,8 siehe Seite 3, Zeile 1-45	12
X	WO 97 13489 A (SCHWABE WILLMAR GMBH & CO ;ERDELMEIER CLEMENS (DE); GRETHLEIN ECKH) 17. April 1997 siehe Anspruch 15 siehe Seite 5, Zeile 11-17	12



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"g" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. Mai 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19/05/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Goetz, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00737

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0599307	A	01-06-1994	DE	4239959 A	01-06-1994
			AT	170080 T	15-09-1998
			DE	59308924 D	01-10-1998
			ES	2121918 T	16-12-1998
<hr/>					
WO 9713489	A	17-04-1997	DE	19619512 C	31-07-1997
			AT	174511 T	15-01-1999
			AU	1589197 A	30-04-1997
			CA	2233277 A	17-04-1997
			CN	1198097 A	04-11-1997
			DE	19646977 A	15-01-1998
			DE	59601019 D	28-01-1999
			EP	0854726 A	29-07-1998
			ES	2118686 T	01-10-1998
			JP	11500743 T	19-01-1999
			NO	981352 A	25-03-1998
			PL	328136 A	18-01-1999
<hr/>					

THIS PAGE BLANK (USPTO)